Wirkung von Gonadotropinen auf Plasmasteroide normaler und kastrierter Meerschweinchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Peter Bühner

1969

Saarbrücken
1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Endokrinologischen Abteilung am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann)

WIRKUNG VON GONADOTROPINEN AUF PLASMASTEROIDE NORMALER UND KASTRIERTER MEERSCHWEINCHEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von
Peter Bühner

geb. am 28.1.1940 in Borna/Leipzig

Referent: Prof. Dr. G.W. Oertel
Dekan: Prof. Dr. H. Witter

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am
29. 12. 1969 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 3

II. Methode 13

A. Aufarbeitung des Tiermaterials 14

B. Chemische Aufarbeitung 14

III. Ergebnisse 22

IV. Diskussion 26

V. Zusammenfassung 31

VI. Literaturverzeichnis 32

I. Einleitung

Nachdem es BUTENANDT (9) 1934 erstmals gelungen war, die Struktur eines Steroids, nämlich des Dehydroepiandrosterons (DHEA), sicherzustellen, folgte sehr bald die Strukturaufklärung von zahlreichen Vorstufen und Abbauprodukten biologisch aktiver Hormone, die sich schließlich in ein mehr oder minder vollständiges Stoffwechselschema einordnen ließen (14). Um die folgenden kurzen Ausführungen über die Biogenese adrenaler Steroide zu verdeutlichen, sei in Abb. 1 das Grundgerüst sämtlicher Steroide an Hand der Formel von Cholesterin veranschaulicht.

Durch oxydative Abspaltung eines Teiles der Seitenkette zwischen C-20 und C-22 entsteht aus Cholesterin Pregnenolon. Aus letzterem wird durch Oxydation der 3-ß-OH-Gruppe und Einwirkung einer Isomerase, welche die Doppelbindung in den Ring A zwischen C-4 und C-5 verlagert, Progesteron gebildet. Zusätzliche Hydroxylierungsreaktionen an C-11, C-17 und C-21 lassen schließlich

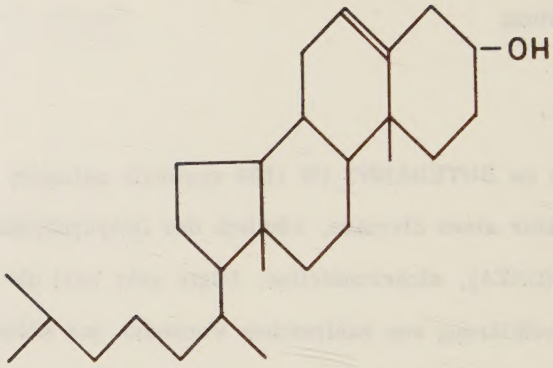

Abbildung 1: Cholesterin als Grundgerüst sämtlicher Steroidhormone.

Cortisol entstehen. Ein weiterer, sehr wesentlicher Schritt führt vermittels oxydativer Abspaltung der restlichen Seitenkette von Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA), dem Hauptvertreter adrenaler Androgene. DHEA stellt neben Androstendion, das auch aus Progesteron gebildet werden kann, die Ausgangsstufe für verschiedene biochemische Folgereaktionen dar, die schließlich zu Testosteron und Östrogen führen.

Alle diese Steroide liegen nicht nur in freier, sondern auch in konjugierter Form vor.

Die Bedeutung der erstmals aus Harnextrakten isolierten Konjugate sah man lange Zeit lediglich darin, die mehr oder minder hydrophoben Steroide einer Ausscheidung durch die Niere zugänglich zu machen. Das fast ausschließliche Auftreten von konjugierten 17-Ketosteroiden im Plasma (1, 4, 46, 47, 49) ließ jedoch daran denken, daß Konjugate nicht nur eine unwirksame Steroidform darstellen, sondern gegebenenfalls eine physiologische Bedeutung besitzen (41). Bestärkt wurde diese Annahme durch Untersuchungen im Nebennieren-Venenblut, in dem man auf Grund vergleichsweise höherer Konzentrationen auch Steroidkonjugate als Sekretionsprodukte identifizieren konnte (39, 48, 50).

Schließlich gelang an Hand einer Reihe von Arbeiten der Nachweis, daß Biogenese und Metabolismus von Steroiden nicht nur auf die freie Form beschränkt ist, sondern auch bei Konjugaten vonstatten gehen kann (2, 3, 51, 52, 70). Dies gilt besonders für die Sulfokonjugate, doch scheint auch ein direkter Metabolismus von Glucuronosiden (33, 34, 69) möglich, d.h. ohne daß der Säurerest abgespalten wird. In einigen Fällen zeigte sich sogar ei-

ne Bevorzugung des Metabolismus konjugierter Steroide gegenüber dem der freien Verbindungen, wie dies bei der Bebrütung von Plazenta-Aromatase mit DHEA und Androstendion bzw. deren Sulfokonjugaten zum Ausdruck kam. Es bildeten sich aus den sulfokonjugierten Steroiden mehr Oestrogene als aus den freien Verbindungen (57). Bei eingehender und doch schonender Untersuchung der an Schwefelsäure gebundenen Steroide lassen sich zwei verschiedene Formen isolieren. Einmal findet man das Steroid an Schwefelsäure gebunden und somit in wasserlöslicher Form, zum andern aber in lipophiler Form als Steroidsulfat-Diglyzerid-Komplex (54, 55). In Anlehnung an die chemische Struktur der Phosphatide wurden diese Konjugate Sulfatide genannt. Im Gegensatz zu den ersteren Verbindungen stellen Sulfatide sehr labile Verbindungen dar und zerfallen leicht in Steroidsulfat und Diglyzerid, so daß ihre Isolierung einige Schwierigkeiten bereitet.

Eine brauchbare und zu reproduzierbaren Ergebnissen führende Methode stellt die Isolierung der Sulfatide mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex dar (53).

Die Sulfatide (Abb. 2 = DHEA-Sulfatid) unterscheiden sich von den Sulfaten nicht nur in Bezug auf ihre Löslichkeit, sondern auch in biologischer Hinsicht. Der Metabolismus von Sulfaten in der Leber verläuft anders als der von Sulfatiden (68, 81), was nicht zuletzt für die Exkretion von Steroiden in die Galle entscheidend ist (32, 44). Auch die Menge des bei einmaliger, kurzzeitiger Nierenperfusion am Meerschweinchen von der Niere zurückbehaltenen Steroids ist bei Sulfat und Sulfatid verschieden (67).

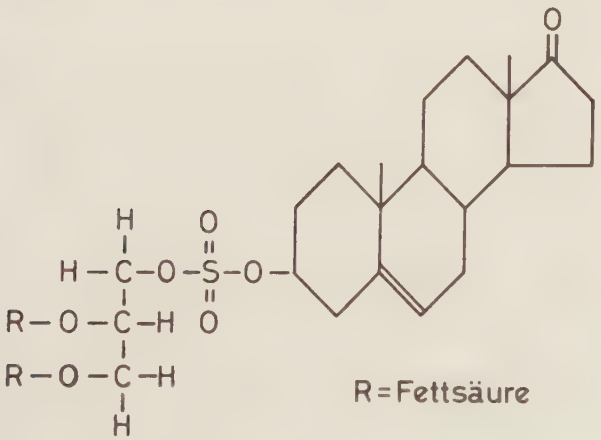

Abbildung 2: Dehydroepiandrosteronsulfatid

Außerdem weisen beide Konjugate verschieden lange Plasmahalbwertzeiten auf. So besitzt das DHEA-Sulfatid eine wesentlich längere Plasmahalbwertzeit als das DHEA-Sulfat (82).

Es kann somit als erwiesen angesehen werden, daß Steroidkonjugaten - insbesondere Sulfokonjugaten - eine physiologische Bedeutung zukommt. Inwieweit solchen Verbindungen eine Spezifität hinsichtlich ihres Wirkungsortes zuzuschreiben ist, läßt sich noch nicht abschätzen.

Die einzelnen Schritte der Biosynthese von Steroiden bzw. Steroid-Konjugaten fügen sich sinnvoll in den Funktionskreis des Zwischenhirn-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems ein und unterliegen somit einer Steuerung. Das bedeutsamste Stimulans für die Bildung adrenaler Steroide stellt das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) dar, dessen wesentliche Wirkung in der Neubildung von Pregnenolon aus Cholsterin beruht (18, 19, 22, 78). Andererseits wird die Ausschüttung von ACTH im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus durch Cortisol gehemmt (25, 40).

Außerdem mögen aber noch weitere Angriffspunkte des ACTH in der Biosynthese von Corticoiden in Erwägung gezogen werden (10).

Was den Transport von Steroiden im Plasma anbetrifft, so sind Wechselbeziehungen einzelner Steroide untereinander bekannt, wie etwa zwischen Östrogenen und Cortisol, wobei Transcortin als cortisolbindendes Globulin eine Rolle spielt (38, 80).

In diesem Zusammenhang wird den anabol wirksamen Substanzen wie Testosteron und seinen Derivaten ein Einfluß auf die Nebennierenrindenfunktion zugeschrieben, wenngleich darüber im einzelnen bisher keine Einigung erzielt werden konnte. So sprechen einige Autoren von einer protektiv nivellierenden, andere von einer stimulierenden Wirkung der Androgene (37). Entsprechend kann nach Kastration der Ausfall testikulärer Androgene einen Einfluß auf die Funktion der Nebennierenrinde haben, die sich aber im allgemeinen in weniger tiefgreifenden Veränderungen von Harn- und Plasmasteroiden äußert (11, 16, 21, 45, 59, 74, 79). Erschwerend scheint hier, daß der-

artigen Problemen eine ausgesprochene Artspezifität anhaftet. Während bei Ratten nach Kastration eine Hypertrophie aller Rindenschichten auftritt, ist diese bei Meerschweinchen nicht ausgeprägt (5, 43, 83). Weitere Einflüsse auf den Steroidhaushalt der Nebennierenrinde sind von Seiten der peripheren Konjugation zu erwarten. Bei chronischen Leberschäden zeigte sich z.B. eine signifikante Erniedrigung der Harnsteroide (31).

Auch die Funktionslage des reticuloendothelialen Systems kann Einflüsse auf die Konjugation ausüben, wie dies aus einer Reihe von Arbeiten über die Stimulierung des reticuloendothelialen Systems des Meerschweinchens mittels Nukleinsäuremetaboliten hervorgeht (26, 27, 28, 29, 30, 64).

Neben der Bestimmung von Plasmaspiegeln freier und konjugierter Steroide sowie Bebrütungsversuchen mit markierten Steroiden interessierten auch in vivo-Untersuchungen über die Konjugation radioaktiv markierten Cortisols nach Stimulation des reticuloendothelialen Systems mit Hilfe von Milzextrakten (50). Außerdem wurden weitere Stimulantien des Endokriniums auf ihre Wirksamkeit bezüglich

der Konjugation untersucht. ACTH-Applikation erbrachte eine verminderte Konjugation, wohl als Verdünnungseffekt durch endogenes Cortisol. Bei den gleichzeitig mitbestimmten 17-Ketosteroiden vermißte man nach ACTH-Applikation einen Anstieg der Plasmaspiegel, der hingegen bei operierten Tieren auftrat. Experimentell ließ sich eine entsprechende Zunahme der 17-Ketosteroide im Plasma auch durch Injektion von Gonadotropinen erzielen.

Wenngleich man geneigt ist, diesen Anstieg als Effekt der Gonaden anzusehen, so kann ein direkter Einfluß der Gonadotropine auf die Nebennierenrinde nicht ausgeschlossen werden. Die Frage einer Wirkung von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde wurde verschiedentlich schon untersucht.

So nahm man bei Untersuchungen an Fischen eine Stimulierung der Biosynthese von Corticosteroiden durch Gonadotropine an (73).

Morphologische Untersuchungen an der Nebennierenrinde zeigten nach Gabe von ICSH zwar eine Erhöhung des Zellvolumens, aber keinen Einfluß auf die Desoxyribonukleinsäure (71).

Andere Autoren dagegen lehnen einen adrenalen Angriff der Gonadotropine ab (23, 42).

Da diese Frage bislang keineswegs geklärt werden konnte, schien es interessant, die Plasmaspiegel von Steroiden bei normalen und kastrierten männlichen Meerschweinchen nach Injektion von Serum-Gonadotropin zu untersuchen.

II. Methode

Die Untersuchungen wurden an 40 erbreinen, männlichen Meerschweinchen vom Stamm "Pigbright white" durchgeführt. Das Gewicht der Tiere betrug 400 ± 40 Gramm.

Die Haltung der Tiere erfolgte vor und während des Versuches unter konstanten Bedingungen. Die Fütterung bestand aus Standardfutter (Altromin MS der Fa. Altrogge, Lage/Lippe) (6) sowie Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 22 ^{o} C.

Die Tiere wurden nach folgendem Schema in vier Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Normaltiere

Gruppe 2: normale Tiere mit Serumgonadotropin behandelt

Gruppe 3: kastrierte Tiere

Gruppe 4: kastrierte Tiere mit Serumgonadotropinen behandelt

A. Aufarbeitung des Tiermaterials

Die Kastration der Tiere erfolgte drei Wochen vor Versuchsbeginn.
In Nembutal-Äther-Narkose wurde nach Durchtrennen von Haut und Bindegewebe der Hoden hervorgezogen und der Stiel nach vorheriger Torsion abgebunden und durchtrennt. Anschließend wurden die Wunden zweischichtig vernäht und mit Nebacetinpuder behandelt. Den Meerschweinchen der Gruppen 2 und 4 wurden i.m. 10 I.E. Predalon-S (Organon, Oss/Holland) injiziert. Fünf Stunden danach wurden die Tiere durch Dekapitation entblutet.

Das durch Zentrifugieren aus dem in vitro heparinisierten Blut (Liquemin, Hoffmann-La Roche) gewonnene und gemessene Plasma gelangte zur chemischen Aufarbeitung wie unten beschrieben.

B. Chemische Aufarbeitung

Extraktion der freien Steroide

Das Plasma wurde durch ausgiebiges Schütteln und Zentrifugieren mit 3 x 2 Volumen Methylenchlorid extrahiert.

Eine erste Reinigung erfolgte durch Waschen mit 0,1 N Natronlauge und mit destilliertem Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurden die Extrakte bei 40 ^{o} C im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Das Restplasma wurde mit 5 Volumen Äthanol-Aceton 1:1 (v/v) versetzt und das ausgefällte Protein durch Filtration abgetrennt.

Anschließend wurden die Lösungen im Rotationsverdampfer fast bis zur Trockne eingedampft.

Säulenchromatographie (56)

Die Chromatographie der nach Ausfällen des Eiweißes im Restplasma enthaltenen Steroidkonjugate erfolgte an DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia fine chemicale, Uppsala/Schweden).

Reinigung und Vorbehandlung des DEAE-Sephadex:

Hierzu wurde DEAE-Sephadex A-50 mit 0,5 N HCl eine Stunde stehengelassen. Nach Dekantieren wusch man anschließend mit destilliertem Wasser bis zu neutraler Reaktion.

Anschließend wurde DEAE-Sephadex mit 0,5 N NaOH versetzt, zwei Stunden lang stehengelassen und erneut mit destilliertem Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen.

Das derartig aktivierte DEAE-Sephadex wurde in 80 %igem Methanol suspendiert und auf Säulen gegeben (Durchmesser 2 cm), bis eine Höhe des Ionenaustauschers von etwa 8 cm erreicht war.

Der bis auf 1 ml eingedampfte Rückstand mit den Steroidkonjugaten wurde mit 4 ml Chloroform-Methanol 1:9 (v/v) verdünnt und auf die Säule gebracht.

Nacheinander eluierte man mit 15 - 20 ml Methanol-Chloroform-Wasser 1:9:2 (v/v) und 80 %igem Methanol, um Glucuronoside und Sulfatide zu eluieren.

Nach zusätzlicher Elution mit destilliertem Wasser liessen sich die Steroid-Sulfate mit 25 ml 15 %igem $(NH_4)_2SO_4$ eluieren, zu dem 1 - 2 ml 2 N H_2SO_4 zugesetzt waren, so daß schließlich das Eluat sauer reagierte.

Die wässrige Phase wurde mit 3 x 2 Volumen Äthylacetat

extrahiert, der Gesamtextrakt mit festem Natriumbicarbonat geschüttelt und schließlich eingedampft.

Trennung von Sulfatiden und Glucuronosiden:

Die Trennung von Glucuronosiden und Sulfatiden erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt).

Als Laufmittel diente das Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol-Ammoniak 20:5:0,2 (v/v). Die Glucuronoside blieben am Auftragsort zurück, während die Sulfatide bzw. die sich zu Sulfaten zersetzenden Sulfatide bei Entwicklung wanderten.

Solvolyse (8):

Die zur Trockne eingedampften Sulfokonjugate (Sulfate ebenso wie Sulfatide) wurden durch 15stündige Bebrütung in 0,01 N Perchlorsäure in Äthylacetat bei 37 ^{o} C solvolysiert. Es folgte die Reinigung mit 1 N NaOH und destilliertem Wasser.

Anschließend wurden die Lösungen eingedampft und der jeweilige Rückstand in 3 ml 1 %iger KOH in Äthanol aufgenommen. Nach einer Stunde bei Zimmertemperatur füllte

man mit destilliertem Wasser auf ungefähr 12 ml auf und extrahierte zweimal mit je 1 Volumen Benzol-Petroläther 1:1 (v/v), bevor die Lösungen zur Trockne eingedampft wurden.

Enzymatische Hydrolyse:

Der Spaltung von Steroid-Glucuronosiden diente die enzymatische Hydrolyse mittels ß-Glucuronidase. Es kamen je Probe 5000 E. Glucuronidase in Form von Ketodase (Warner Chilcott, Morris Plains, N.J.) zur Anwendung.

Die Hydrolyse erfolgte durch 48stündige Bebrütung bei 37 ^{o} C in Acetatpuffer von pH 4,75. Danach wurde das Hydrolysat dreimal mit Äthylacetat extrahiert, der Extrakt mit 1 N NaOH und Wasser gewaschen und bei 35 ^{o} C im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

Entfettung:

Die freigesetzten sowie die ursprünglich freien Steroide wurden in 70 %igem Methanol gelöst, mit 250 mg Aluminiumoxyd versetzt und 3 Stunden bei - 18 ^{o} C gehalten, bevor man in der Tiefkühlzentrifuge zentrifugierte. Nach Dekantieren wur-

de die klare Lösung unter Zusatz von Äthanol-Benzol 1:1 (v/v) zur Trockne eingedampft.

Trennung von Corticoiden und 17-Ketosteroiden:

Die Trennung von Corticoiden und 17-Ketosteroiden erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt) im System Chloroform-Äthanol 19:1 (v/v).

Die Elution der mit Hilfe von chromatographierten Testsubstanzen ermittelten, steroidhaltigen Chromatogrammabschnitte wurde nach Desaktivierung durch einige Tropfen Wasser und je 1 Tropfen Eisessig mit Methanol vorgenommen.

Bestimmung der 17-Ketosteroide mit Hilfe der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktion (76, 77):

Die Rückstände der Proben wurden in 0,1 ml 0,3 % DNPH in Äthylacetat gelöst und eingedampft. Danach gab man 1 ml 0,03 %ige Trichloressigsäure in absolutem Benzol hinzu, ließ eine halbe Stunde bei 40 ^{o} C im Wasserbad stehen und dampfte dann erneut ein. Anschließend erfolgte eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G im System Chloro-

form-Dioxan 94:6 (v/v).

Die Chromatographie der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide geschah mit reinem Chloroform.

Nach Elution der entsprechenden Abschnitte mittels Chloroform wurden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone in 3 ml Chloroform aufgenommen und bei 372 nm im Beckman-Spektrometer TK 2 gegen einen entsprechenden Leerwert photometriert. Die Ausrechnung erfolgte mit Hilfe der Allen-Korrektur.

Porter-Silber-Reaktion (60):

Die durch Dünnschichtchromatographie abgetrennten Corticosteroide wurden mit Hilfe der Porter-Silber-Reaktion quantitativ bestimmt.

Hierzu löste man den Trockenrückstand in 0,25 ml absolutem Äthanol, gab 3 ml Methylenchlorid hinzu und extrahierte die Porter-Silber-Chromogene mit 0,5 ml einer Lösung von 65 mg Phenylhydrazinhydrochlorid in 100 ml 62 %iger H_2SO_4. Nach 25 Sekunden intensiven Schüttelns wurde das Gemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten, 6 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert und der Methylenchloridüberstand abgesaugt.

Dann stellte man die Proben 40 Minuten in ein Wasserbad von 60 ^{o} C und bestimmte die Extinktion bei 405 nm gegen 62 %ige H_2SO_4 als Leerwert.

III. Ergebnisse

Die Kastration wurde von allen Tieren gut vertragen. Bei einer Inspektion des Operationsgebietes nach Dekapitation der Tiere zeigte sich eine reizlose Abheilung, so daß eventuelle Veränderungen im Steroidhaushalt - bedingt durch eine chronisch-entzündliche Reaktion - ausgeschaltet werden konnten. Hinsichtlich des Körpergewichtes kastrierter und normaler Tiere waren keine signifikanten Unterschiede zu bemerken.

Zeitpunkt und Dosis der Gonadotropininjektion wurden in Vorversuchen ermittelt.

Da das Plasma von 3 - 4 Tieren gepoolt wurde, geben die Tabellen 1 bis 3 jeweils die Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen wieder. Auf Grund der relativ geringen Anzahl an Einzelwerten wurde auf eine statistische Auswertung des Versuches verzichtet.

In Tabelle 1 sind die Plasmaspiegel der 17-Hydroxycorticosteroide aufgeführt, die mit Hilfe der Porter-Silber-Reaktion ermittelt wurden. Lediglich in der Fraktion der

freien Steroide trat nach Kastration und Gonadotropingabe eine Erhöhung dieser Steroide auf, während in der Fraktion der gesamten Konjugate keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Die geringe Ausbeute an Corticosteroid-Sulfatiden bei Kastraten (Gruppe III) dürfte wohl in einer stärkeren Zersetzung der Sulfatide zu Sulfaten im Verlauf der Chromatographie an DEAE-Sephadex zu suchen sein.

Tabelle 1: Freie und konjugierte Corticosteroide in µg/100 ml Plasma.

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
Freie Steroide	17,0	16,9	17,2	25,5
Sulfatide	12,7	14,6	8,1	10,5
Sulfate	22,0	28,9	37,2	32,7
Glucuronoside	8,7	10,8	16,7	8,9
Gesamtkonjugate	43,4	54,3	52,0	52,1

Tabelle 2: Freie und konjugierte 11-Desoxy-17-Ketosteroide in µg/100 ml Plasma.

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
Freie Steroide (davon "Dione")	5,3 (1,7)	14,0 (3,0)	7,1 (2,7)	9,0 (3,3)
Sulfatide	10,6	17,8	15,2	21,9
Sulfate	31,8	30,8	20,7	20,2
Glucuronoside	14,0	13,8	14,1	17,9
Gesamtkonjugate	56,4	62,4	50,1	60,0

Tabelle 3: Freie und konjugierte 11-oxygenierte 17-Ketosteroide in µg/100 ml Plasma.

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
Freie Steroide	1,7	3,4	2,7	1,7
Sulfatide	1,7	1,1	2,7	2,0
Sulfate	0,8	0,3	0,8	0,0
Glucuronoside	2,9	1,2	1,4	1,1
Gesamtkonjugate	5,4	2,6	4,9	3,1

Bei den 11-Desoxy-17-Ketosteroiden fällt auf, daß es sowohl bei den Normaltieren als auch bei den Kastraten nach Injektion von Serum-Gonadotropin zu einem Anstieg der freien Steroide kam. Besonders deutlich wird dies, wenn man die Untergruppe der "Dione" betrachtet. Eine weitere Differenzierung unterblieb hier wie auch bei anderen Steroidgruppen.

Ein Anstieg nach Gonadotropin-Injektion zeigte sich gleichfalls bei den Sulfatiden dieser Steroide, während die Gesamtkonjugate keine wesentlichen Schwankungen erkennen ließen.

In der Gruppe der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide trat nach Gonadotropin-Injektion bei normalen und kastrierten Tieren eine Erhöhung der freien und eine Verminderung der konjugierten Steroide im Plasma auf.

IV. Diskussion

Auf Grund der konstanten Umweltbedingungen hinsichtlich Futter und Haltung konnten Umstellungsreize und damit unerwünschte Reaktionen ausgeschaltet werden. Der Zeitraum zwischen Kastration und dem Hauptversuch gewährleistete die weitgehende Ausschaltung von störenden Einflüssen wie etwa eines Operationsstresses (61).

Die in Gruppe I ermittelten Normalwerte entsprechen den Ergebnissen früherer Untersuchungen (62, 63). Während der Anstieg der freien 11-Desoxy-17-Ketosteroide im Plasma bei den mit Gonadotropin vorbehandelten Normaltieren seine Erklärung in einer Steigerung der testikulären Sekretion finden könnte, trifft dies für die entsprechend behandelten Kastraten nicht zu. Hier muß ein adrenaler Effekt des Gonadotropins erwogen werden. Die relativ hohe Konzentration dieser Verbindungen bei unbehandelten Kastraten dürfte seine Ursache in einer gesteigerten endogenen FSH-Aktivität haben (17).

Weisen die Gesamtfraktionen konjugierter 11-Desoxy-17-Ketosteroide keine deutlichen Unterschiede innerhalb der vier Gruppen auf, so läßt sich dennoch eine Verschiebung in den darin enthaltenen Konjugatfraktionen feststellen. Unter Gonadotropineinfluß kommt es nämlich zu einem Anstieg der Sulfatide, die - wie eingangs erwähnt - eine Vorrangstellung in biologisch-metabolischer Hinsicht innehaben.

Die Werte der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide zeigten zwar gewisse Veränderungen nach Kastration und Gonadotropininjektion, ohne daß sich jedoch Rückschlüsse hinsichtlich einer Beeinflussung des peripheren Metabolismus (72) (wie etwa Seitenkettenabspaltung bei Corticosteroiden) ziehen ließen.

Bei dem Verhalten der Corticosteroide scheint auffällig, daß bei den kastrierten und mit Serum-Gonadotropin behandelten Tieren eine beachtliche, über die Norm hinausgehende Steigerung der Sekretion freier Steroide eintrat. Inwieweit dies auf einer überschießenden Reaktion bei Ausfall bzw. Reduktion der protektiv-wirksamen Androgene

beruht, wie sie in der Einleitung erwähnt wurde, oder aber durch eine vermehrte Bereitstellung von Präcursoren bedingt ist, läßt sich an dieser Stelle nicht klären.

Entsprechende Ergebnisse erzielte man mit einem FSH-Präparat bei gleicher Versuchsanordnung. Als wesentlichster Befund mag dabei die signifikante Steigerung des DHEA-Sulfatids im Plasma gelten (65).

Ob es sich bei den beobachteten Wirkungen tatsächlich um eine FSH-Wirkung handelt, bleibt offen, da bisher keine eindeutige Trennung dieser beiden Gonadotropine gelang und daher die Zusammensetzung der benutzten Gonadotropinpräparate nicht eindeutig festlag. Eine Verunreinigung mit ACTH kann allerdings weitgehend ausgeschlossen werden. Einmal sind die Veränderungen bei den Plasmaspiegeln der Corticosteroide nicht ausgeprägt und zum andern konnte gezeigt werden, daß ACTH beim Meerschweinchen keinen Einfluß auf die Plasmaspiegel der 11-Desoxy-17-Ketosteroide hat (12, 66).

Betrachtet man die hier gefundenen Ergebnisse im Zusammenhang mit Bebrütungsversuchen, in deren Verlauf Nebennieren

normaler und kastrierter Meerschweinchen mit und ohne Zusatz von Serum-Gonadotropinen (15) oder FSH-Präparaten (65) inkubiert wurden, so wird die Annahme einer adrenalen Gonadotropineinwirkung nur bekräftigt. Aus zugesetztem 7 ^{3}H-Cholesterin bildeten sich vermehrt Sulfokonjugate unter Gonadotropineinfluß. Des weiteren ließ sich die Ausbeute an sulfokonjugiertem Pregnenolon und DHEA durch FSH steigern. Es wäre demnach an eine Stimulierung der adrenalen Sulfokinasen zu denken, auf die eine Stimulierung der Biogenese adrenaler Androgene durch vermehrte Bereitstellung sulfokonjugierter Präcursoren folgt. Daneben könnte außerdem ein weiterer Mechanismus in Betracht kommen, zeigten doch Untersuchungen am Corpus luteum als spezifische Gonadotropinwirkung eine vermehrte Bildung von 20 -Hydroxycholesterin aus Cholesterin, wohl durch verstärkte Aktivität der 20 -Hydroxylase (24, 35). Geht man von der Annahme aus, daß die frühen Schritte in der Biogenese von Steroiden im Corpus luteum und in der Nebennierenrinde einander entsprechen (36), so ließe sich dieser Mechanismus auch auf die hier dargestellten Befunde übertragen. Schließlich wäre noch zu berücksichtigen,

daß Gonadotropine eventuell die direkte Bildung von DHEA aus Cholesterin bzw. 20α-Hydroxycholesterin unter Umgehung des Pregnenolons als Zwischenstufe begünstigen könnte. Eine derartige Möglichkeit wurde bereits verschiedentlich diskutiert (7, 20).

Welcher dieser Erklärungen der Vorzug zu geben oder inwieweit eine Kombination dieser Mechanismen anzunehmen ist, bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten.

Zusammenfassend darf wohl festgestellt werden, daß zumindest beim Meerschweinchen die Gonadotropine eine deutliche Wirkung auf die Nebennierenrindenfunktion ausüben.

V. Zusammenfassung

Bei insgesamt 40 männlichen, erbreinen Meerschweinchen, von denen die Hälfte kastriert worden war, bestimmte man den Einfluß von Serum-Gonadotropin auf die Plasmaspiegel der Corticosteroide und 17-Ketosteroide.
Als hervorstechendes Ergebnis zeigte sich nach Injektion von Gonadotropin bei Kastraten eine Erhöhung der freien und der an Sulfatidsäure gebundenen 11-Desoxy-17-Ketosteroide. Diese Ergebnisse bestätigen den Einfluß von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde.

VI. Literaturverzeichnis

1. BAULIEU, E.E.: J. clin. Endocr. Metab. 20: 900 (1960)

2. BAULIEU, E.E.; CORPECHOT, C.; DRAY, F.; EMILIOZZI, R.; LEBEAU, M.C.; MAUVAIS, P.; JARVIS, E.; ROBEL, P.: Rec. Progr. Hormone Res. 21: 411 (1965)

3. BAULIEU, E.E.; CORPECHOT, C.; EMILIOZZI, R.: Steroids 2: 429 (1963)

4. BAULIEU, E.E.; EMILIOZZI, R.; CORPECHOT, C.: Experientia 17: 110 (1961)

5. BENNET, T.; EVANS, H.: Anat. Rec. 108: 597 (1950)

6. BROCK, N.; WILK, W.: Arzneimittelforsch. 12: 64 (1962)

7. BURSTEIN, S.; DORFMANN, R.J.: Acta endocr. (Kbh.) 40: 188 (1962)

8. BURSTEIN, S.; LIEBERMANN, S.: J. biol. Chem. 233: 33 (1959)

9. BUTENANDT, A.: zit. bei: DORFMANN, R.J. und SHIPLEY, R.A.: Androgens; Weley J. u. Sons. Inc., p. 29, New York 1956

10. COST, W.S.: in: Structure and Metabolism of Corticosteroids; ed. by Pasqualini J.R. and Jayle, M.F., Acad. Press. London/New York, p. 127, 1964

11. DANOWSKI, T.S.: Clinical Endocrinology, Vol. I, Williams & Wilkins Comp., p. 323, Baltimore 1962

12. DIETERICH, P.; RINDT, W.; KAISER, E.: Endokrinologie 50: 251 (1966)

13. DINNERSTEIN, J.; LANMAN, J.T.: Endocrinology 68: 164 (1961)

14. DOCUMENTA GEIGY: S. 399 ff. (1960)

15. EBERSOHL, C.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: Endokrinologie 52: 63 (1967)

16. FURMAN, R.H.; HOWARD, R.P.: J. clin. Endocr. Metab. 19: 1680 (1959)

17. GANS, E.; DE JOUGH, S.E.: Acta endocr. (Kbh.) 43: 323 (1963)

18. GRANT, J.K.: in: Structure and Metabolism of Corticosteroids, ed. by Pasqualini, J.R. and Jayle, M.F., p. 140, Acad. Press. London/ New York 1964

19. GRIFFITHS, K.; GRANT, J.K.; SYMINGTON, I.: J. clin. Endocr. Metab. 23: 1044 (1963)

20. GUAL, C.; LAMP, A.E.; KLINE, J.T.; GUT, M.; DORFMAN, R.J.: J. clin. Endocr. Metab. 22: 1193 (1962)

21. HAMILTON, J.B.; BUNCH, L.D.; MESTLER, G.E.: J. clin. Endocr. Metab. 19: 1680 (1959)

22. HAYNES, R.C.: Fed. Proc. 17: 376 (1958)

23. HUIS IN'T VELD, L.G.; LOUWERENS, B.; VAN DER SPEK, P.A.F.: I. Int. Congr. Endocrinology, Copenhagen 1960; Periodica Copenhagen, p. 539, 1960

24. ICHII, S.; FORCHIELLI, E.; DORFMAN, R.I.: Steroids 3: 531 (1964)

25. JAMES, V.H.T.; LONDON, V.J.: in: Structure and Metabolism of Corticosteroids, ed. by Pasqualini, J.R. and Jayle, M.F., p. 55, Acad. Press. London/ New York 1964

26. KAISER, E.; RINDT, W.: Klin. Wschr. 42: 646 (1964)

27. KAISER, E.; RINDT, W.: Dtsch. med. Forsch. 2: 163 (1964)

28. KAISER, E.; RINDT, W.: Endokrinologie 49: 69 (1965/ 1966)

29. KAISER, E.; RINDT, W.: Mat. med. Nordmark 17: 543 (1965)

30. KAISER, E.; RINDT, W.; ZIMMERMANN, W.: Acta hepatosplenol. 11: 321 (1964)

31. KAISER, E.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: 12. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1966

32. KNAPSTEIN, P.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: 12. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1966

33. KNAPSTEIN, P.; RINDT, W.; WENDLBERGER, F.; OERTEL, G.W.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 348: 93 (1967)

34. KNAPSTEIN, P.; WENDLBERGER, F.; OERTEL, G.W.: Experientia 23: 851 (1967)

35. KORITZ, S.B.: Biochem. Biophys. Acta 56: 63 (1962)

36. KOWAL, J.; FORCHIELLI, E.; DORFMAN, R.I.: Steroids 3: 531 (1964)

37. KRÜSKEMPER, H.L.: Anabole Steroide; G. Thieme Verlag, p. 65, 1963

38. LAYNE, D.S.; MEYER, C.J.; VEISHWANAR, P.S.; PINCUS, G.: J. clin. Endocr. 22: 107 (1962)

39. LIEBERMANN, S.: IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 111: 2 (1966)

40. LONG, C.N.H.: Am. Rev. Physiol. 18: 409 (1956)

41. MASON, M.; GULLEKSON, E.: J. Amer. chem. Soc. 81: 1517 (1959)

42. MATTIOLI, G.; MONETA, W.: Ann. Ostet. Ginec. 84: 518 (1962)

43. MAZER, M.; MAZER, C.: Endocrinology 26: 662 (1940)

44. NEISER, J.; RINDT, W.; KNAPSTEIN, P.; OERTEL, G.W.: Europ. J. Steroids 1: 15 (1966)

45. NICOLA, A.A.; LANTOS, C.P.; TRAMEZZIANI, J.H.: Experientia 18: 467 (1962)

46. OERTEL, G.W.: Biochem. Z. 334: 431 (1961)

47. OERTEL, G.W.: Clin. chim. Acta 8: 154 (1963)

48. OERTEL, G.W.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 336: 236 (1964)

49. OERTEL, G.W.; KAISER, E.: Clin. chim. Acta 7: 463 (1962)

50. OERTEL, G.W.; KAISER, E.; ZIMMERMANN, W.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 331: 77 (1963)

51. OERTEL, G.W.; KNAPSTEIN, P.; TREIBER, L.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 345: 221 (1966)

52. OERTEL, G.W.; KNAPSTEIN, P.; RINDT, W ; TREIBER, L.: IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 111: 141 (1966)

53. OERTEL, G.W.; KAISER, E.: Biochem. Z. 336: 10 (1962)

54. OERTEL, G.W.; RINDT, W.: IInd Symp. Steroid Hormones, Ghent 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 101: 192 (1966)

55. OERTEL, G.W.; GROOT, K.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 341: 1 (1965)

56. OERTEL, G.W.; KAISER, E.: Clin. chim. Acta 7: 221 (1962)

57. OERTEL, G.W.; TREIBER, L.; RINDT, W.: Experientia 23: 97 (1967)

58. PASQUALINI, J.R.: IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 111: 140 (1966)

59. POCHI, P.E.; STRAUSS, J.S.; MESCON, H.: J. Invest. Dermatol. 39: 475 (1962)

60. PORTER, C.C.; SILBER, R.H.: J. biol. Chem. 185: 201 (1952)

61. RINDT, W.: Inauguraldissertation, Homburg-Saar 1965

62. RINDT, W.; KAISER, E.; ZIMMERMANN, W.: Acta hepatosplenol. 12: 98 (1965)

63. RINDT, W.; KAISER, E.; ZIMMERMANN, W.: Endokrinologie 47: 3 (1964)

64. RINDT, W.; KAISER, E.: Mat. med. Normark 16: 499 (1964)

65. RINDT, W.; OERTEL, G.W.: 13. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Würzburg 1967

66. RINDT, W.: Persönliche Mitteilung.

67. RINDT, W.; OERTEL, G.W.: Acta endocr. (Kbh.) 55: 656 (1967)

68. RINDT, W.; WEINAND, K.; OERTEL, G.W.: 12. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1966; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967, p. 292

69. ROBEL, P.R.; EMILIOZZI, R.; BAULIEU, E.E.: J. Biol. Chem. 241: 20 (1966)

70. ROBERTS, K.D.; GURPIDE, E.; LIEBERMANN, S.: IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 111: 140 (1966)

71. ROELS, H.: Exp. Cell. Res. 31: 407 (1963)

72. SCHULZ, K.D.; PLATE, P.; MAASS, H.; BETTENDORF, G.: Acta endocr. (Kbh.) 100: 127 (1965)

73. SUNDRARARAJ, B.T.; GOSWAMI, S.V.: IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966; Excerpta Med. Found. Int. Congr. Series 111: 368 (1966)

74. TAMM, J.; APOSTOLAKIS, M.; VOIGT, K.D.: Acta endocr. (Kbh.) 100: 49 (1965)

75. TONUTTI, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 52: 32 (1942)

76. TREIBER, L.; OERTEL, G.W.: Z. klin. Chemie 5: 83 (1967)

77. TREIBER, L.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: Z. klin. Chemie 5: 102 (1967)

78. UAYANO, M.: Rec. Progr. Hormone Res. 12: 79 (1956)

79. VERMEULEN, A.: in: Structure and Metabolism of Corticosteroids, ed. by Pasqualini, J.R. and Jayle, M.F.; Acad. Press. London/ New York 1964, p. 109

80. VERMEULEN, A.; FERIN, J.: Acta endocr. (Kbh.) 39: 22 (1962)

81. WEINAND, K.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: Endokrinologie 50: 145 (1966)

82. WEINAND, K.; RINDT, W.; OERTEL, G.W.: Acta endocr. (Kbh.) 51: 210 (1966)

83. ZALESKY, M.: Anat. Rec. 65: 467 (1963)

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Anleitung danke ich Herrn Professor Dr. G.-W. Oertel.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Hygiene und Mikrobiologie danke ich Herrn Professor Dr. med., Dr. phil. Dipl. Chem. W. Zimmermann.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Rindt für die hilfreiche Unterstützung und Anleitung beim experimentellen Teil der Arbeit.

Lebenslauf

Am 28. Januar 1940 wurde ich als Sohn des Augenarztes Dr. med. E. Bühner und seiner Ehefrau Maria, geb. Brinkmann, in Borna, Bez. Leipzig, geboren.

Von 1946 bis 1954 besuchte ich die Volksschulen in Borna und Wuppertal, anschließend bis zu meinem Abitur das Staatliche Aufbaugymnasium in Unna/Westfalen.

Mein medizinisches Studium begann ich im Sommersemester 1961 an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken und beendete es im Wintersemester 1967/68 in Homburg-Saar.